

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C07K 14/81, A61K 38/57, C07K 1/16</b>	<b>A1</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/56821</b>
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. Dezember 1998 (17.12.98)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT98/00130	(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) Internationales Anmeldedatum: 20. Mai 1998 (20.05.98)	
(30) Prioritätsdaten: A 1007/97 10. Juni 1997 (10.06.97) AT	
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT [AT/AT]; Industriestrasse 67, A-1221 Wien (AT).	
(72) Erfinder; und	Veröffentlicht
(75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): MATTES, Erwin [AT/AT]; Mozartgasse 36, A-2380 Perchtoldsdorf (AT). MATTHIESSEN, H., Peter [DE/AT]; Waltergasse 12/2/6, A-1040 Wien (AT).	Mit internationalem Recherchenbericht.
(74) Anwälte: SONN, Helmut usw.; Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).	

(54) Title: ALPHA 1-ANTITRYPsin PREPARATION AND METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF

(54) Bezeichnung: ALPHA 1-ANTITRYSIN-PRÄPARATION SOWIE VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG

## (57) Abstract

The invention relates to a native chromatographically purified  $\alpha$ 1-AT preparation, having a purity of at least 0.7 PE/mg protein and a relative plasma  $\alpha$ 1-AT activity of at least 120 %. The active-inactive  $\alpha$ 1-AT ratio is greater than in plasma. The invention also relates to a method for producing said preparation and to the use of a carrier material, e.g. an inorganic carrier material such a hydroxylapatite, to separate active  $\alpha$ 1-AT from inactive  $\alpha$ 1-AT.

## (57) Zusammenfassung

Beschrieben wird eine native, chromatographisch gereinigte  $\alpha$ 1-AT-Präparation, die eine Reinheit von wenigstens 0,7 PE/mg Protein und eine relative Plasma- $\alpha$ 1-AT-Aktivität von mindestens 120 % aufweist. Das Verhältnis von aktivem zu inaktivem  $\alpha$ 1-AT ist größer als in Plasma. Des Weiteren wird ein Verfahren zur Herstellung dieser Präparation beschrieben sowie die Verwendung eines Trägermaterials, beispielsweise eines anorganischen Trägermaterials, wie Hydroxylapatit, zur Trennung von aktivem  $\alpha$ 1-AT von inaktivem  $\alpha$ 1-AT.

### ***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

<b>AL</b>	Albanien	<b>ES</b>	Spanien	<b>LS</b>	Lesotho	<b>SI</b>	Slowenien
<b>AM</b>	Armenien	<b>FI</b>	Finnland	<b>LT</b>	Litauen	<b>SK</b>	Slowakei
<b>AT</b>	Österreich	<b>FR</b>	Frankreich	<b>LU</b>	Luxemburg	<b>SN</b>	Senegal
<b>AU</b>	Australien	<b>GA</b>	Gabun	<b>LV</b>	Lettland	<b>SZ</b>	Swasiland
<b>AZ</b>	Aserbaidschan	<b>GB</b>	Vereinigtes Königreich	<b>MC</b>	Monaco	<b>TD</b>	Tschad
<b>BA</b>	Bosnien-Herzegowina	<b>GE</b>	Georgien	<b>MD</b>	Republik Moldau	<b>TG</b>	Togo
<b>BB</b>	Barbados	<b>GH</b>	Ghana	<b>MG</b>	Madagaskar	<b>TJ</b>	Tadschikistan
<b>BE</b>	Belgien	<b>GN</b>	Guinea	<b>MK</b>	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	<b>TM</b>	Turkmenistan
<b>BF</b>	Burkina Faso	<b>GR</b>	Griechenland	<b>ML</b>	Mali	<b>TR</b>	Türkei
<b>BG</b>	Bulgarien	<b>HU</b>	Ungarn	<b>MN</b>	Mongolei	<b>TT</b>	Trinidad und Tobago
<b>BJ</b>	Benin	<b>IE</b>	Irland	<b>MR</b>	Mauretanien	<b>UA</b>	Ukraine
<b>BR</b>	Brasilien	<b>IL</b>	Israel	<b>MW</b>	Malawi	<b>UG</b>	Uganda
<b>BY</b>	Belarus	<b>IS</b>	Island	<b>MX</b>	Mexiko	<b>US</b>	Vereinigte Staaten von Amerika
<b>CA</b>	Kanada	<b>IT</b>	Italien	<b>NE</b>	Niger	<b>UZ</b>	Usbekistan
<b>CF</b>	Zentralafrikanische Republik	<b>JP</b>	Japan	<b>NL</b>	Niederlande	<b>VN</b>	Vietnam
<b>CG</b>	Kongo	<b>KE</b>	Kenia	<b>NO</b>	Norwegen	<b>YU</b>	Jugoslawien
<b>CH</b>	Schweiz	<b>KG</b>	Kirgisistan	<b>NZ</b>	Neuseeland	<b>ZW</b>	Zimbabwe
<b>CI</b>	Côte d'Ivoire	<b>KP</b>	Demokratische Volksrepublik Korea	<b>PL</b>	Polen		
<b>CM</b>	Kamerun	<b>KR</b>	Republik Korea	<b>PT</b>	Portugal		
<b>CN</b>	China	<b>KZ</b>	Kasachstan	<b>RO</b>	Rumänien		
<b>CU</b>	Kuba	<b>LC</b>	St. Lucia	<b>RU</b>	Russische Föderation		
<b>CZ</b>	Tschechische Republik	<b>LI</b>	Liechtenstein	<b>SD</b>	Sudan		
<b>DE</b>	Deutschland	<b>LK</b>	Sri Lanka	<b>SE</b>	Schweden		
<b>DK</b>	Dänemark	<b>LR</b>	Liberia	<b>SG</b>	Singapur		
<b>EE</b>	Estland						

- 1 -

Alpha 1-Antitrypsin-Präparation sowie  
Verfahren zu deren Herstellung

Die Erfindung betrifft Alpha 1-Antitrypsin-Präparationen, Verfahren zu deren Herstellung sowie Verwendungen dieser Präparationen.

Alpha-1-Antitrypsin ( $\alpha_1$ -AT) ist ein in Plasma vorkommendes Protein, welches auf Grund seiner strukturellen und funktionellen Eigenschaften in die Superfamilie der Serpine eingeordnet wird (Serine protease inhibitors). Auf Grund seiner Serinprotease inhibierenden Wirkung ist  $\alpha_1$ -AT auch unter dem Namen  $\alpha_1$ -Proteinase-Inhibitor bekannt.  $\alpha_1$ -AT ist für ungefähr 90 % der trypsinischen Inhibitionskapazität von Normalplasma verantwortlich, weshalb es oft auch als Haupt-Plasma-Serpin (Major plasma serpin) bezeichnet wird. Von besonderer physiologischer Bedeutung ist die inhibitorische Aktivität des  $\alpha_1$ -AT bezüglich der Elastase.

$\alpha_1$ -AT ist primär ein Schutzprotein, wodurch Zellen von freigesetzten proteolytischen Enzymen geschützt werden sollen. Es wird in der Leber synthetisiert und ins Plasma sekretiert, worin es eine Halbwertszeit von ungefähr 6 Tagen hat. Die normale Plasmakonzentration von  $\alpha_1$ -AT beträgt 1,3 g/l.

$\alpha_1$ -AT ist ein relativ kleines und polares Molekül, welches schnell in die Zellflüssigkeiten gelangt und dort wirken kann. Menschliches  $\alpha_1$ -AT besteht aus einer einzigen Polypeptidkette mit 394 Aminosäureresten mit drei Glykosylierungspositionen an den Asparaginresten der Positionen 46, 83 und 247. Während an Asparagin 46 und 247 sowohl zwei- als auch drei-antennige sialisierte Kohlehydrat-Seitenketten vorhanden sind, ist an Asparagin 83 nur eine sialisierte bi-antennige Seitenkette vorhanden (Carrell et al., Nature 298 (1982), 329-334).

Die Proteinkette von  $\alpha_1$ -AT kommt in zwei Formen im Plasma vor, wobei in der einen Form ein N-terminales Pentapeptid entfernt ist.

- 2 -

Aufgrund dieser Kohlehydrat-Seitenketten, aber auch aufgrund der möglichen Pentapeptid-Entfernung kommt es zu einer recht ausgeprägten Mikroheterogenität, welche sich in ein und demselben Individuum auch ändern kann. So kommt es vor, daß erhebliche Änderungen in den Proportionen dieser Isoformen der  $\alpha$ 1-AT-Moleküle während Entzündungen oder Östrogenverabreichungen vorkommen, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß aufgrund der Stresssituation die teilweise desialysierten Formen bevorzugter abgebaut werden, um schneller wieder zu normalen Plasma-Levels zu kommen (Patterson, Comp. Biochem. Physiol. 100 B (3) (1991), 439-454).

Die Serinprotease inhibierende Wirkung von  $\alpha$ 1-AT ist auf die Formation von stabilen 1:1-Komplexen zwischen  $\alpha$ 1-AT und der Zielprotease zurückzuführen.  $\alpha$ 1-AT wirkt daher als eine Art "Suizidsubstrat", mit welcher die weitere Proteasereaktion der Serinprotease unterbunden wird. Die Wirkung von  $\alpha$ 1-AT wird vor allem von freigesetzten Radikalen inhibiert, die ebenfalls im Zuge von Entzündungen entstehen. Physiologisch dient diese Oxidationslabilität wahrscheinlich dazu, in der unmittelbaren Umgebung der Entzündung die Enzym-inhibierende Aktivität von  $\alpha$ 1-AT zu unterbinden, so daß Proteasen, wie Elastase und Kathepsin G ihre volle Wirkung bei der Bekämpfung beispielsweise entzündungsauslösender Bakterien entfalten können.

Die Oxidationslabilität von  $\alpha$ 1-AT ist jedoch vor allem dort nachteilig, wo das  $\alpha$ 1-AT bzw. die Flüssigkeit, die  $\alpha$ 1-AT enthält, exponiert wird, wie z.B. in den Flüssigkeiten des Respirationstraktes. So wird das elastische Gewebe der Lunge vor Oberflächenangriffen im wesentlichen von zwei Inhibitoren geschützt, dem humanen sekretorischen Leukozyten-Proteaseinhibitor, der hauptsächlich im oberen respiratorischen Trakt zu finden ist, und  $\alpha$ 1-AT, welches vorwiegend im unteren respiratorischen Trakt vorkommt. Obwohl normalerweise mehr als genug inhibitorische Kapazität für die Verteidigung des unteren Respirationstraktes vorhanden ist, kann es bei übermäßiger Exposition an freie Radikale, wie z.B. bei starkem Rauchen, zu Problemen kommen (die inhibitorische Kapazität von  $\alpha$ 1-AT ist bei starken Rauchern ungefähr halbiert).

Mittlerweile sind über 70 qualitative und quantitative Varianten von menschlichem  $\alpha_1$ -AT bekannt, die als autosomal co-dominante Allele vererbt werden, wobei davon ausgegangen wird, daß ungefähr 10 % (!) der europäischen Bevölkerung Träger einer pathologischen Variante von  $\alpha_1$ -AT sind. Auch  $\alpha_1$ -AT-Defizienzen sind bekannt und relativ weit verbreitet. Die bemerkenswertesten pathologischen Befunde im Zusammenhang mit der  $\alpha_1$ -AT-Genvarianz sind eine relativ früh beginnende degenerative Lungenerkrankung sowie eine schwere Lebererkrankung. Daneben werden aber auch Nierenerkrankungen, Arthritis und maligne Erkrankungen mit einer  $\alpha_1$ -AT-Genvarianz in Verbindung gebracht. Vor allem bei der Lungenerkrankung ist sicher, daß diese direkt auf den jeweiligen Plasma-level von  $\alpha_1$ -AT zurückzuführen ist, welcher wegen der kumulierten proteolytischen Beschädigung einen Verlust der Lungenelastizität bewirkt. So ist ein starker Raucher mit einem homozygoten  $\alpha_1$ -AT-Mangel doppelt gefährdet und hat ein hohes Risiko, eine schwere Emphysemie bereits im Alter von unter 40 Jahren zu entwickeln. Gegenüber dem nichtrauchenden Homozygoten hatte er eine um 20 Jahre verkürzte Überlebenszeit.

In Plasma kommt das  $\alpha_1$ -AT sowohl in aktiver als auch in inaktiver Form vor (siehe beispielsweise Pajdak W. et al., Folia Histochemica et Cytobiologica, Vol. 24 (1986), S. 169-172).

Es sind eine Reihe von Herstellungsverfahren für  $\alpha_1$ -AT bekannt, welche die fraktionierte Fällung von Plasma mit Polyethylenglykol 4000, aber auch die Aufbereitung von verschiedenen Plasmafraktionen (Cohn-Faktion IV-1-Präzipitat oder Kistler und Nitschmann-Überstand A oder A+1) umfaßt (Feldman und Winkelmann, Blood Separation and Plasma Fractionation (1991), Wiley-Liss, Inc., S. 341-383).

Bei weitergehenden Reinigungen wurden die betreffenden Blutfraktionen beispielsweise mit DEAE-Zellulose gereinigt (Basis et al. (Vopr. Med. Khim. 33 (1) (1987), 54-59)), mit Affinitätschromatographie-Materialien oder mit Kationenaustauscher-Chromatographie-Materialien (EP-0 698 615-A1) behandelt.

Basis et al. beschreiben ein Verfahren zur Aufreinigung von

- 4 -

$\alpha_1$ -AT durch Ammoniumsulfatfällung von Plasma und anschließender DEAE-Zellulose-Chromatographie und Hydroxylapatit-Chromatographie. Dieses Verfahren wurde ständig in Gegenwart von Mercaptoethanol, welches das Protein gegenüber Oxidation S-hältiger Gruppen schützen soll, vorgenommen.  $\alpha_1$ -AT wird nach der Hydroxylapatit-Chromatographie in zwei Fraktionen gewonnen, jedoch werden die beiden Proteine,  $\alpha_1$ -AT und Albumin, nicht vollständig aufgetrennt.

Im Zuge der Vorarbeiten zur vorliegenden Erfindung wurde nun festgestellt, daß es mit allen herkömmlichen Herstellungsverfahren, insbesondere aber auch bei den Verfahren gemäß Basis et al. und gemäß der EP-0 698 615-A1, nicht gelungen ist, das konstitutiv in Plasma mit dem aktiven  $\alpha_1$ -AT vorkommende inaktive  $\alpha_1$ -AT vollständig abzutrennen bzw. eine Präparation unter Erhalt aktiver Isomere herzustellen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit welchem eine  $\alpha_1$ -AT-Präparation gewonnen werden kann, in der das Verhältnis von aktivem  $\alpha_1$ -AT zu inaktivem  $\alpha_1$ -AT zugunsten von aktivem  $\alpha_1$ -AT verbessert wird, d.h., mit welchem inaktives  $\alpha_1$ -AT selektiv von aktivem  $\alpha_1$ -AT abgetrennt werden kann.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, eine gegenüber den herkömmlichen Präparaten verbesserte  $\alpha_1$ -AT-Präparation zur Verfügung zu stellen.

Den Gegenstand der vorliegenden Erfindung bildet daher eine Präparation auf Basis von nativem, chromatographisch gereinigtem  $\alpha_1$ -AT, welche eine Reinheit von wenigstens als 0,7 PE/mg Protein und eine relative Plasma- $\alpha_1$ -AT-Aktivität von mindestens 120 % aufweist.

Die relative Plasma- $\alpha_1$ -AT-Aktivität ist definiert als das Verhältnis von aktivem zu inaktivem  $\alpha_1$ -AT, wobei dieses Verhältnis in Plasma mit 100 % relativer Plasma- $\alpha_1$ -AT-Aktivität angenommen wird. Für die erfindungsgemäß zur Verfügung gestellten Präparationen liegt diese relative Plasma- $\alpha_1$ -AT-Aktivität vorzugsweise

- 5 -

über 130 %, noch bevorzugter über 140 %, insbesondere über 150 %. In besonderen Fällen liegt die relative Plasma- $\alpha$ 1-AT-Aktivität auch über 160 %. Bei den erfindungsgemäßen Produkten ist aufgrund deren Reinheit das enthaltene Protein annähernd mit dem  $\alpha$ 1-AT-Protein gleichzusetzen, wodurch die relative Plasma- $\alpha$ 1-AT-Aktivität in einfacher Weise zu berechnen ist.

$\alpha$ 1-AT liegt in Blut bzw. Serum zu einem gewissen Anteil immer auch in inaktiver Form vor, d.h. es besitzt praktisch keine Elastase hemmende Aktivität, ist aber noch immunreakтив. Die Gesamtmenge an (aktivem und inaktivem)  $\alpha$ 1-AT kann mit allen gängigen Methoden bestimmt werden, z.B. Antigen-quantifizierende immunologische Methoden, wie ELISA.

Die Ursachen für das Vorliegen von inaktivem  $\alpha$ 1-AT können manigfältig sein, beispielsweise kann  $\alpha$ 1-AT aufgrund einer Spaltung des Moleküls oder aufgrund von Störungen in der Konformation inaktiv sein.

Da normalerweise im Blut bzw. Serum bis zu 20 % inaktives  $\alpha$ 1-AT vorhanden sein können und dieses mit herkömmlichen Methoden nicht abgetrennt werden konnte, stellt die erfindungsgemäße Präparation einen wesentlichen Fortschritt gegenüber herkömmlichen  $\alpha$ 1-AT-Präparaten, in denen bislang immer der inaktive Anteil "mitgeschleppt" worden war, dar. Wie erwähnt, liegt die Konzentration von  $\alpha$ 1-AT in Normalplasma bei 1,3 g/l, womit sich eine spezifische Aktivität von 0,77 PE (Plasmaeinheiten, bestimmt im Elastase-Hemmtest, siehe Beispiel 3) /mg ergibt.

Das erfindungsgemäße  $\alpha$ 1-AT-Präparat enthält vorzugsweise wenigstens das Isomer mit einem pI-Wert zwischen 4,3 und 4,4.

Es hat sich nämlich überraschenderweise gezeigt, daß gerade aufgrund der Anwesenheit dieses Isomers die Aktivität des  $\alpha$ 1-AT sehr hoch ist. Da das Isomer mit einem pI-Wert zwischen 4,3 und 4,4 aufgrund seiner aziden Natur in den im Stand der Technik beschriebenen Verfahren zur Gewinnung von  $\alpha$ 1-AT immer zusammen mit Albumin von der zu gewinnenden  $\alpha$ 1-AT-Fraktion abgetrennt worden ist, finden sich in keinem  $\alpha$ 1-AT-Präparat bislang nennenswerte

- 6 -

Anteile an diesem Isomer. Im Zuge der vorliegenden Erfindung wurde jedoch die Relevanz gerade dieses Isomers bezüglich der Aktivitätsausbeute erkannt und es werden daher erfindungsgemäß im Herstellungsverfahren bevorzugterweise nur Schritte vorgesehen, die eine Abtrennung dieses Isomers vom übrigen  $\alpha 1$ -AT nicht oder nur zu einem unwesentlichen Teil erlauben, sodaß auch der Großteil dieses sauren Isomers im Endpräparat vorhanden ist.

Die Isomerenverteilung der bevorzugten Präparation entspricht also der des nativen Proteins, insbesondere dem Protein, das aus einem Plasmapool erhältlich ist. Insbesondere entspricht die Isomerenverteilung der erfindungsgemäßen  $\alpha 1$ -AT-Präparation bei Sichtbarmachung durch isoelektrische Fokussierung (IEF) einem Quadruplett-Bandenmuster.

Die IEF wird insbesondere mit dem von Pharmacia erhältlichen Gel Ampholine PAG plate IEF™ (pH 4,0 - 6,5 oder pH 4,0 - 5,0) entsprechend der von Pharmacia gegebenen Vorschrift unter Verwendung von IEF-Markern der Firma Sigma (IEF Mix 3,6 - 6,6) durchgeführt.

Das Isomer mit einem pI-Wert zwischen 4,3 und 4,4 entspricht dabei der sauersten Bande. Dieses Isomer fehlt aber gerade bei reinen bzw. hochreinen  $\alpha 1$ -AT-Präparationen gänzlich bzw. ist es nur in einem geringen Ausmaß unterhalb der Nachweisgrenze enthalten.

Die erfindungsgemäße  $\alpha 1$ -AT-Präparation weist insbesondere eine hohe Reinheit auf, beispielsweise eine Reinheit von mehr als 0,8 PE/mg, bevorzugterweise eine Reinheit von mehr als 0,9 PE/mg, am meisten bevorzugt von mehr als 1 PE/mg. Es hat sich sogar gezeigt, daß erfindungsgemäß Reinheiten von über 1,1 PE/mg, insbesondere von über 1,2 PE/mg, erzielbar sind.

Die erfindungsgemäße Präparation enthält dabei üblicherweise weniger als 10 %, vorzugsweise weniger als 5 %, insbesondere weniger als 2 % inaktives  $\alpha 1$ -AT.

Es ist gemäß der vorliegenden Erfindung auch möglich, ein  $\alpha 1$ -AT-

Präparat zur Verfügung zu stellen, welches im wesentlichen frei ist von inaktivem  $\alpha_1$ -AT.

Das Verhältnis von aktivem  $\alpha_1$ -AT zu inaktivem  $\alpha_1$ -AT ist in der erfindungsgemäßen Präparation erhöht, insbesondere ist es höher als jenes in humanem Normalplasma. Es ist also gemäß der vorliegenden Erfindung möglich, ein hyperaktives bzw. als naszent zu bezeichnendes  $\alpha_1$ -AT zu erhalten.

Unter Normalplasma ist gemäß der vorliegenden Erfindung ein bezüglich des Gehaltes an aktivem  $\alpha_1$ -AT standardisiertes Plasma zu verstehen. Die Standardisierung, also die Bestimmung von aktivem  $\alpha_1$ -AT kann mittels hierfür gängiger Methoden erfolgen. Beispielsweise mittels Hemmung der Elastase- bzw. Trypsinaktivität.

Die erfindungsgemäße Präparation hat dabei gegenüber den Präparationen gemäß dem Stand der Technik den wesentlichen Vorteil, daß das insbesondere zur pharmazeutischen Verabreichung vorgesehene Präparat durch den niedrigeren Gehalt an inaktivem  $\alpha_1$ -AT hinsichtlich seiner Wirksamkeit sehr viel definierter ist als die bekannten Präparate, was besonders bei medizinischer Verwendung von enormen Vorteil ist.

Bevorzugterweise wird ein konservierendes  $\alpha_1$ -AT zur Verfügung gestellt, bei welchem die Verwendung von Oxidationsstabilisatoren, wie  $\beta$ -Mercaptoethanol, vermieden werden kann. "Konservierend" bedeutet daher im Rahmen der vorliegenden Erfindung, daß das  $\alpha_1$ -AT auch ohne die Anwesenheit von Oxidationsstabilisatoren, wie  $\beta$ -Mercaptoethanol, ausreichend stabil ist, was insbesondere angesichts der bekannten großen Oxidationslabilität von  $\alpha_1$ -AT besonders überraschend war.

Die erfindungsgemäße Präparation kann ausgehend von Blut, Plasma, Serum, oder Fraktionen derselben, aber auch ausgehend von Zellkulturen, insbesondere rekombinannten Zellkulturen, oder Zellkulturüberständen hergestellt werden.

Bevorzugterweise ist der Monomergehalt der erfindungsgemäßen Präparation mindestens 95 %, vorzugsweise mindestens 98 %.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Präparates besteht darin, daß die Präparation nicht nur hinsichtlich des Gehaltes an aktivem  $\alpha_1$ -AT verbessert ist, sondern daß sie auch in hoher Reinheit vorliegt, beispielsweise von mindestens 90 % (mg/mg Protein).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch eine pharmazeutische Präparation, enthaltend die erfindungsgemäße  $\alpha_1$ -AT-Präparation, gegebenenfalls mit pharmazeutisch annehmbaren Hilfssubstanzen, wie Puffer, Stabilisatoren, Adjuvantien, Antioxidantien, Salzen oder Exzipienten.

Da die vorliegende Präparation hauptsächlich im pharmazeutischen Bereich eingesetzt werden soll, besteht eine bevorzugte Ausführungsform darin, daß die Präparation zur Inaktivierung gegebenenfalls vorhandener Pathogene behandelt ist. Günstigerweise wird die Präparation in einer laberstabilen Form zur Verfügung gestellt, vorzugsweise als Lyophilisat oder als (tiefgefrorene) Lösung, insbesondere als eine Lösung, welche zur i.v.-Verabreichung, als Aerosol oder als Spray geeignet ist. Die Präparation kann auch mit Liposomen bzw. Phospholipiden oder anderen mikro- oder nanopartikulären Formen assoziiert vorliegen, was bei bestimmten Applikationsformen vorteilhaft ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen  $\alpha_1$ -AT-Präparates durch Reinigung einer  $\alpha_1$ -AT enthaltenden Fraktion, welche vorzugsweise aus einem humanen Plasmapool mittels Adsorptionschromatographie derart erhältlich ist, daß  $\alpha_1$ -AT adsorbiert, gegebenenfalls inaktives  $\alpha_1$ -AT abgetrennt wird und aktives  $\alpha_1$ -AT in einer Fraktion durch Eluieren gewonnen wird.

Unter Adsorptionschromatographie ist gemäß der vorliegenden Erfindung eine solche Chromatographie zu verstehen, bei der das  $\alpha_1$ -AT an das Chromatographiematerial adsorbiert (gebunden) wird. Schließlich kann durch Elution die gewünschte Fraktion gewonnen werden.

Für die Adsorptionschromatographie kann beispielsweise ein anor-

- 9 -

ganisches Chromatographiematerial, wie z.B. Hydroxylapatit, bevorzugterweise keramisches Hydroxylapatit, eingesetzt werden. Die Adsorptionschromatographie kann aber auch an einem Anionenaustauscher, bevorzugterweise in Gegenwart eines Detergents, durchgeführt werden.

Als Anionenaustauscher werden bevorzugterweise Materialien auf Basis von Kohlenhydraten oder Vinylpolymeren eingesetzt, die sich in der Laborarbeit und industriellen Anwendung bewährt haben, insbesondere kommerziell erhältliche Produkte, wie beispielsweise DEAE-Sephacel®, DEAE-Sephadex®, DEAE-Sepharose® CL6B, DEAE-Sepharose® Fast Flow, QAS-Sephadex®, Q-Sepharose® Fast Flow, Q-Sepharose Big Beats®, Q-Sepharose® High Performance (Fa. Pharmacia); DEAE-Trisacryl, DEAE-Spheredex®, Q-Hyper-D® (Fa. Sepracor); DEAE-Toyopearl®, QAE-Toyopearl®, Toyopearl Super-Q® (Fa. Tosohas); Fractogel®-EMDT, -TMAE oder andere Fractogelmaterialien, Licsospher 1000 TMAE®, Licsospher 1000 DEAE® und Licsospher 4000 DMAE® (Fa. Merck); Macroprep DEAE®, Macroprep Q® (Fa. BioRad); Protein PAK DEAE® (Fa. Waters), wobei die Behandlung mit einem starken Anionenaustauscher, z.B. Q-Sepharose besonders bevorzugt ist. Die genauen Bedingungen, bei welchen die Gewinnung von aktivem  $\alpha$ 1-AT erfolgt, können je nach Austauschermaterial schwanken; diese sind aber für den Fachmann für das jeweilige Material in Kenntnis der vorliegenden Erfindung leicht und ohne großen Aufwand zu ermitteln bzw. zu optimieren.

Bevorzugterweise wird das Ausgangsmaterial bei bzw. vor der Adsorptionschromatographie nicht bzw. nur für sehr kurze Zeit (z.B. wenige Minuten) inkubiert. Die Adsorptionschromatographie bzw. Gewinnung des  $\alpha$ 1-AT erfolgt insbesondere unter solchen Bedingungen, daß das Isomer mit einem pI-Wert zwischen 4,30 und 4,40, insbesondere zwischen 4,34 und 4,39, erhalten bleibt, und besonders bevorzugt derart, daß das Spektrum aktiver Isomere auch während bzw. nach der Reinigung bzw. Behandlung erhalten bleibt. Diese Bedingungen sind durch Ausprobieren von verschiedenen Elutionspuffern für die jeweils verwendeten Adsorptionsmaterialien für den Fachmann leicht optimierbar, da das Isomer mit einem pI-Wert zwischen 4,3 und 4,4 bzw. Fraktion, in der

- 10 -

dieses Isomer enthalten ist, leicht durch IEF selektierbar ist. Hierbei muß insbesondere darauf geachtet werden, daß dieses saure Isomer nicht mit Albumin abgetrennt wird. Dies ist für den Fachmann jedoch ohne weiteres, z.B. mit Gelelektrophorese bzw. IEF-Überprüfung der eluierten Fraktionen (und der Detektion von saurem  $\alpha_1$ -AT und Albumin), möglich.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird keine Chromatographie an einem Kationenaustauscher durchgeführt, insbesondere keine Kationenaustauscher-Chromatographie bei niedrigem pH-Wert.

Unter einem Detergens (Tensid) ist üblicherweise eine grenzflächenaktive organische Substanz zu verstehen, insbesondere organische Syntheseprodukte. Erfindungsgemäß werden vorzugsweise nichtionische Detergentien verwendet, wie Polyether, insbesondere Alkyl-, Phenol-, Polyglykolether, Produkte der Ethoxylierung von Fettsäuren, Fettsäureamiden, Fettaminen, Fettalkoholen, Aminoxiden, Fettsäureester von Polyalkoholen und Zuckerestern. Das Detergens (Tensid) wirkt insbesondere auf Proteine nicht denaturierend. Besonders bevorzugt ist für die Zwecke der vorliegenden Erfindung ein Tensid aus der Gruppe der Polysorbate (z.B. Tween) und ein Tensid aus der Triton®-Gruppe.

Der Adsorptionschromatographie kann beim erfindungsgemäßen Verfahren gemäß einer bevorzugten Ausführungsform eine weitere Behandlung, wie z.B. eine Fällung, Filtration, Gelfiltration, Behandlung mit einem anorganischen Trägermaterial oder eine chromatographische Reinigung vor- oder nachgeschaltet sein. Als bevorzugtes anorganisches Trägermaterial hat sich dabei Hydroxylapatit herausgestellt, wobei keramisches Hydroxylapatit besonders bevorzugt wird. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Adsorptionschromatographie an einem Anionenaustauscher, vorzugsweise in Gegenwart eines Detergents, mit einer Adsorption an Hydroxylapatit kombiniert.

Im Zuge der Arbeiten zur vorliegenden Erfindung hat sich überraschenderweise herausgestellt, daß es unter besonderen Umständen möglich ist, auch durch die Behandlung mit anorganischen

- 11 -

Materialien, wie Hydroxylapatit, eine Trennung von aktivem  $\alpha 1$ -AT von inaktivem  $\alpha 1$ -AT herbeizuführen. Dieser Effekt tritt dann besonders hervor, wenn das  $\alpha 1$ -AT bereits wesentlich von Albumin abgetrennt ist.

Daher ist auch die Behandlung einer vorgereinigten  $\alpha 1$ -AT-Präparation mit dem anorganischen Trägermaterial, insbesondere mit Hydroxylapatit, alleine geeignet, eine erfindungsgemäße Präparation herzustellen. Bevorzugterweise wurde aus dem Ausgangsmaterial Albumin bereits vorher zu einem hohen Prozentsatz entfernt. Die Abtrennung des aktiven  $\alpha 1$ -AT erfolgt bevorzugterweise durch fraktionierte Elution. Die Behandlung mit Hydroxylapatit stellt bevorzugterweise den terminalen Reinigungsschritt dar.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß, obwohl  $\alpha 1$ -AT bekanntermaßen extrem oxidationslabil ist, das erfindungsgemäße Verfahren auch ohne Anwendung von  $\beta$ -Mercaptoethanol oder anderen Oxidationshemmern durchgeführt werden kann, die speziell bei der Herstellung von pharmazeutischen Präparaten zu vermeiden sind.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird daher bevorzugterweise in Abwesenheit von  $\beta$ -Mercaptoethanol oder anderen Oxidationsstabilisatoren durchgeführt, d.h., es werden keine Puffer verwendet, die einen derartigen Stabilisator enthalten.

Das Ausgangsmaterial stammt bevorzugterweise von einem Plasmapool, insbesondere einem solchen, der sich aus Blutspenden von  $\alpha 1$ -AT-normalen Individuen ergibt. Für das erfindungsgemäße Verfahren werden bevorzugterweise Plasma oder eine Plasmafraktion verwendet, insbesondere eine an Albumin abgereicherte Ausgangsfraktion, vorzugsweise ein Cohn V-Niederschlag, entsprechend im wesentlichen einer Cohn IV A-Fraktion (gemäß Cohn, Review 28 (1941), 395-417). In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird von einer vorgereinigten Fraktion ausgegangen, beispielsweise kann von einem kommerziell erhältlichen Präparat, wie Prolastin, ausgegangen werden.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren wird auch vorzugsweise ein Schritt zur Inaktivierung bzw. Abreicherung von gegebenenfalls

- 12 -

vorhandenen Pathogenen durchgeführt. Diese Inaktivierungs-/Abreicherungsbehandlung wird vorzugsweise durch eine Tensid- und/oder Hitzebehandlung gewährleistet, beispielsweise einer Hitzebehandlung in festem Zustand, insbesondere einer Dampfbehandlung gemäß der EP-0 159 311 oder der EP-0 519 901 oder der EP-0 674 531, aber auch mit organischen Lösungsmitteln und/oder Detergentien, wie z.B. gemäß der EP-0 131 740 und EP-0 050 061.

Weitere Behandlungen zur Inaktivierung von Viren bzw. Pathogenen umfassen auch die Behandlung mit chemischen oder chemisch/physikalischen Methoden, z.B. mit chaotropen Stoffen gemäß der WO 94/13329 oder DE-44 34 538 oder eine Photoinaktivierung.

Eine Bestrahlung oder Nanofiltration stellen bevorzugte physikalische Verfahren zur Abreicherung von Viren im Rahmen der vorliegenden Erfindung dar.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorzugsweise derart konzipiert, daß dabei auch die Gewinnung von anderen Proteinen möglich ist, insbesondere die Gewinnung von Transferrin, Albumin, Orosomucoid und Apolipoprotein, welche dann in einer weiteren Fraktion der erfindungsgemäßen chromatographischen Behandlungen gewonnen werden können. Die genauen Bedingungen können für jedes Chromatographiematerial von einem Fachmann in Kenntnis der vorliegenden Erfindung leicht ermittelt bzw. optimiert werden.

Der pH-Wert bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, insbesondere bei der Elution, liegt vorzugsweise zwischen 5,5 und 8,0, insbesondere um 6,5-6,8. Es hat sich auch gezeigt, daß bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens die Verwendung eines Puffers mit einer Ionenstärke entsprechend 10 mM an Phosphat günstig ist.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung eines Trägermaterials zur Trennung des inaktiven  $\alpha_1$ -AT von aktivem  $\alpha_1$ -AT. Als festes Trägermaterial zur Adsorption und Trennung wird vorzugsweise ein anorganisches Trägermaterial, wie Hydroxylapatit, verwendet oder ein Anionenaustauscher in Gegenwart von einem Detergens, insbesondere Q-Sepharose

- 13 -

in Gegenwart von Tween, in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform.

Die vorliegende Erfindung wird an Hand der nachfolgenden Beispiele, auf die sie jedoch nicht beschränkt sein soll, näher erläutert.

**B e i s p i e l e :**

**B e i s p i e l 1: Reinigung von  $\alpha_1$ -AT aus Cohn V-Niederschlag**  
(derzeit nach Ansicht der Anmelderin der  
beste Weg zur Ausführung der Erfindung)

Der Cohn V-Niederschlag wird mit dem dreifachen Gewicht an A-Puffer ( $1,2 \text{ g/l } \text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O} = 6,74 \text{ mM}$ ,  $10 \text{ g/l NaCl} = 171 \text{ mM}$ , pH 7,0 mit 96 % Essigsäure gestellt) 4 bis 6 Stunden bei 4°C durch Rühren suspendiert. Danach wird  $\alpha_1$ -AT aus dieser trüben Suspension mit 17,5 % Ethanol Endkonzentration bei 6°C über Nacht gefällt.

Der abzentrifugierte Niederschlag wird mit dem 24-fachen Gewicht 10 mM Tris-HCl, pH 10,4 (mit 6 M NaOH gestellt) eine  $\frac{1}{2}$  Stunde bei Raumtemperatur und anschließend 1,5 Stunden bei 40°C gerührt, danach der pH auf 6,5 gestellt und durch ein CUNO 50SA-Filter geklärt. Dem Filtrat werden 15 % v/v Tween 80 zugesetzt und 2 Stunden bei 26°C gerührt.

Die erhaltene Lösung wird auf eine, mit Q-Sepharose® Fast Flow (Pharmacia) gefüllte und mit 25 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,5, äquilibrierte Chromatographiesäule, entsprechend 10 mg Protein pro ml Gel (etwa 2 Säulenvolumen) aufgetragen, mit 2,5 Säulenvolumen 25 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,5 (eluiert dabei großteils Tween® 80) und weiters mit 3 Säulenvolumen 60 mM Natriumchlorid in 25 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,5 (eluiert Transferrin), gewaschen.

Durch Elution mit 3 Säulenvolumen 100 mM Natriumchlorid in 25 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,5, erhält man die  $\alpha_1$ -AT enthaltende Fraktion mit etwa 0,40 bis 0,60 Plasmaeinheiten (PE)  $\alpha_1$ -AT pro

- 14 -

mg Protein, wobei die Aktivität durch Hemmung von Elastase gemäß Beispiel 3 bestimmt wurde (1 PE  $\alpha$ 1-AT entspricht etwa 1,3 mg reinem  $\alpha$ 1-AT).

Mit 3 Säulenvolumen 125 mM Natriumchlorid in 25 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,5, können dann noch hauptsächlich Serumalbumin und weitere Plasmaproteine eluiert werden und mit 1 bis 2 M Natriumchlorid in 25 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,5, inaktives  $\alpha$ 1-AT (praktisch keine Elastasehemmung, aber immunreaktives  $\alpha$ 1-AT) und die restlichen Verunreinigungen.

Die  $\alpha$ 1-AT enthaltende Fraktion wird mit einer Ultrafiltrationsmembran (Ausschlußgrenze 30 000 Dalton) etwa 30-fach konzentriert und mit 0,15 g/l Na<sub>3</sub>-Citrat  $\times$  2 H<sub>2</sub>O = 0,5 mM, diafiltriert.

Das erhaltene Diafiltrat wird anschließend lyophilisiert. Das lyophilisierte Pulver wird auf einen Restwassergehalt von 7,5 +/- 0,5 % befeuchtet und der S-TIM 4-Behandlung gemäß der EP-0 159 311 unterzogen (10 Stunden bei 60°C und 1 Stunde bei 80°C).

Das behandelte Pulver wird in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,8, zu etwa 10 mg/ml Protein gelöst und auf eine, mit keramischem Hydroxyapatit (Macropep Typ I, Korngröße 80  $\mu$ m, Bio-Rad) gefüllte und mit 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,8, äquilierte Chromatographiesäule entsprechend 10 mg Protein pro ml Säulenbett (etwa 1 Säulenvolumen), aufgetragen.

Durch Elution mit 5 Säulenvolumen 40 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,8, erhält man die  $\alpha$ 1-AT enthaltende Fraktion mit etwa 0,90 bis 1,05 Plasmaeinheiten (PE)  $\alpha$ 1-AT pro mg Protein.

Mit 3 Säulenvolumen 100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,8, können dann noch hauptsächlich inaktives  $\alpha$ 1-AT, Serumalbumin und weitere Plasmaproteine eluiert werden und mit 500 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,8, die restlichen Verunreinigungen.

Es zeigte sich, daß mit diesem Reinigungsverfahren  $\alpha$ 1-AT mit hoher spezifischer Aktivität von 1,0 PE/mg (entspricht 130 %

- 15 -

relativer Plasma- $\alpha$ 1-AT-Aktivität) erhalten werden kann. Das Ergebnis ist in der nachfolgenden Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1**

	spez. Aktivität PE/mg	Reinigung	Gesamtausbeute/ % Plasma
Plasma	0,014	1,0	100
nach Hydroxyapatit	1,0	70,0	14

Das am pharmazeutischen Markt befindliche  $\alpha$ 1-AT-Produkt Prolastin (Fa. Cutter) ist laut Herstellerinformation zwischen 45 - 80 % rein und ergibt im Elastasehemmtest eine spezifische Aktivität von 0,60 PE/mg (entspricht 78 % relativer Plasma- $\alpha$ 1-AT-Aktivität).

**B e i s p i e l 2 : Reinigung von  $\alpha$ 1-AT (Serva) mittels keramischem Hydroxyapatit**

$\alpha$ 1-AT von Serva, das mit mindestens 95 % Reinheit (laut Herstellerangaben mittels SDS-Gel bestimmt wurde) die bisher höchste gemessene spezifische Aktivität  $\alpha$ 1-AT von 0,81 PE/mg aufwies, wurde ebenfalls über keramisches Hydroxyapatit weiterbehandelt. Die vereinigten Fraktionen ergaben eine spezifische Aktivität von 0,92 PE/mg (entspricht etwa 120 % relativer Plasma- $\alpha$ 1-AT-Aktivität). In dem reduzierenden SDS-Excelgel sieht man mit Silberfärbung der Proteine eine eindeutige Abtrennung von inaktivem  $\alpha$ 1-AT und anderer verunreinigender Proteine.

**B e i s p i e l 3 : Vorschrift zur Messung der Elastasehemmung**

Der Test wurde in Anlehnung einer Vorschrift von J. Bieth, B. Spiess und C.G. Wermuth (1974), The synthesis and analytical use of a highly sensitive and convenient substrate of elastase, Biochem. Med. 11(4), 350-357, bzw. J. Travis und D. Johnson (1981), Human alpha1-Proteinase Inhibitor, Methods of Enzymology 80, 754-765, erstellt.

- 16 -

- Tris: 0,2 M Tris-HCl, pH 8,0  
Tris+: Tris mit 0,1 % humanem Serumalbumin (HSA) kurz vor Verwendung versetzt.  
Elastase: 6 % Elastase (aus Schweinepankreas, Boehringer Mannheim) wird 1 : 1000 verdünnt und steril filtriert bei -20°C eingefroren.  
Substrat: 22,5 mg Succinyl-(Alanin)<sub>3</sub>-para-Nitroanilid (Bachem Feinchemikalien AG, Schweiz) wird in 5 ml Dimethylformamid aufgelöst und bei 4°C aufbewahrt.

Die Proben werden mit Tris+ bis zur entsprechenden Konzentration verdünnt.

25 µl Elastase werden mit 275 µl Tris+ (im Wasserbad auf 25°C temperiert) verdünnt und mit 100 µl Probe 3 Minuten bei 25°C inkubiert. Danach wird das Substrat 1 : 10 mit Tris+ verdünnt, 200 µl davon zu dem Ansatz gemischt und sofort die Extinktionszunahme bei 405 nm und 25°C über 5 Minuten lang gemessen. Als Leerwert der Hemmung werden statt einer Probe 100 µl Tris+ zum Ansatz gemischt.

Der Leerwert ergibt bei obigem Ansatz zwischen 0,05 bis 0,06 dA/min. Als Standardkurve dient eine Verdünnungsreihe 1:100 bis 1:400 von Referenzplasma (Immuno AG, 1A3E). Das Prolastin (Cutter) wird aus einer 1:50-Vorverdünnung (in Aliquots bei -20°C eingefroren) 1:80 mit Tris+ verdünnt (1:4000-Verdünnung) und mit der 1:150-Verdünnung des Referenzplasmas bei jeder Meßserie mitgemessen. Bei zu starker Abweichung gegenüber der Standardgerade sollte diese Meßserie verworfen werden oder die Ergebnisse nur als ungefähre Richtwerte angesehen werden.

Die Hemmung wird errechnet nach:

% = (1 - (dA/min)<sub>Probe</sub> / (dA/min)<sub>Leerwert</sub>) \* 100. Die Hemmung der Proben soll im Bereich von 20 bis 50 % Hemmung liegen und wird dann mittels der Standardgeraden in Plasmaeinheiten umgerechnet.

**B e i s p i e l 4: Charakterisierung verschiedener α1-AT-Produkte mittels Elastasehemmung**

# Charakterisierung verschiedener A1AT-Produkte mittels Elastasehemmung und IEF

Tabelle 2

Produkt	Protein / mg/ml	Aktivität / PE/ml	spez. Akt. / PE/mg	Reinheit	Reinigung	relative Plasma-A1AT-Aktivität
Plasma	70,00	1,00	0,014	1,7 %	1,0	100,0 %
nach Hydroxylapatit	1,21	1,22	1,009	117,8 %	70,6	131,1 %
Serva (# 13694)	0,44	0,36	0,814	95,0 %	57,0	105,8 %
Sigma (# A-9024)	0,49	0,15	0,299	34,9 %	20,9	n.b.
Prolastin (Cutter)	41,99	23,95	0,570	66,6 %	39,9	n.b.

Produkt	Hauptbanden von A1AT im IEF-Gel		
	pI = 4,55-4,58	pI = 4,47-4,51	pI = 4,41-4,45
Plasma	+	+	+
nach Hydroxylapatit	+	+	+
Serva (# 13694)	+	+	-
Sigma (# A-9024)	+	+	-
Prolastin (Cutter)	+	+	-

+/-
 + kaum sichtbar  
 - vorhanden  
 n.b. nicht vorhanden  
 n.b. nicht berechnet

## P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Native, chromatographisch gereinigte  $\alpha_1$ -AT-Präparation, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Reinheit von wenigstens 0,7 PE/mg Protein und eine relative Plasma- $\alpha_1$ -AT-Aktivität von mindestens 120 % aufweist.
2. Präparation nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie als eine pharmazeutische Präparation vorliegt.
3. Präparation nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus einem Plasmapool gereinigt ist.
4. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Reinheit von mehr als 0,9 PE/mg aufweist, bevorzugterweise mehr als 1,0 PE/mg, am meisten bevorzugt mehr als 1,1 PE/mg, insbesondere mehr als 1,2 PE/mg.
5. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie wenigstens das Isomer mit einem pI-Wert zwischen 4,3 und 4,4 enthält.
6. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil von inaktivem  $\alpha_1$ -AT weniger als 10 %, vorzugsweise weniger als 5 %, insbesondere weniger als 2 %, beträgt.
7. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie frei von inaktivem  $\alpha_1$ -AT ist.
8. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das  $\alpha_1$ -AT ein konservierendes ist.
9. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Isomerenverteilung des  $\alpha_1$ -AT der des nativen Proteins entspricht, insbesondere einem bei isoelektrischer Fokussierung sichtbaren Quadruplett-Bandenmuster.

10. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß sie zur Inaktivierung gegebenenfalls vorhandener Pathogene behandelt ist.

11. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einer lagerstabilen Form vorliegt, vorzugsweise als Lyophilisat oder als Lösung, insbesondere als eine Lösung, geeignet zur i.v.-Verabreichung, als Aerosol oder als Spray.

12. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit Liposomen, Phospholipiden bzw. anderen mikro- oder nanopartikulären Formen assoziiert vorliegt.

13. Verfahren zur Herstellung einer Präparation nach Anspruch 1 durch Reinigung einer  $\alpha_1$ -AT enthaltenden Fraktion, erhältlich mittels Adsorptionschromatographie derart, daß  $\alpha_1$ -AT adsorbiert und aktives  $\alpha_1$ -AT in einer Fraktion durch Eluieren gewonnen wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß als Ausgangsmaterial Plasma oder eine Plasmafraktion, insbesondere eine an Albumin abgereicherte Fraktion, vorzugsweise Cohn V-Niederschlag, eingesetzt wird.

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß von einer vorgereinigten Fraktion ausgegangen wird.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß für die Adsorptionschromatographie ein anorganisches Chromatographiematerial, vorzugsweise Hydroxylapatit, am meisten bevorzugt keramisches Hydroxylapatit, eingesetzt wird.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß für die Adsorptionschromatographie ein Anionenaustauscher, bevorzugterweise in Gegenwart eines Detergens, eingesetzt wird.

- 20 -

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß der Anionenaustauscher Q-Sepharose ist.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Adsorptionschromatographie unter Verwendung eines Puffers durchgeführt wird, der frei von Mercaptoethanol ist.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß der beim Eluieren verwendete Puffer einen pH-Wert zwischen 5,5 und 8,0 aufweist, vorzugsweise um 6,5-6,8.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 16 und 20, dadurch gekennzeichnet, daß der beim Eluieren verwendete Puffer ein Salz mit einer Ionenstärke entsprechend 60 mM, vorzugsweise 40 mM, Phosphat enthält.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 15 und 17 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß der beim Eluieren verwendete Puffer ein Salz mit einer Ionenstärke entsprechend 50 bis 130 mM Natriumchlorid enthält.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß ein weiterer Schritt ausgewählt aus der Gruppe Fällung, Filtration, Gelfiltration, Behandlung mit einem anorganischen Trägermaterial und chromatographische Reinigung durchgeführt wird.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Adsorptionschromatographie an einem Anionenaustauscher, bevorzugterweise in Gegenwart eines Detergens, mit einer Adsorption an Hydroxylapatit kombiniert wird.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß eine einzige Adsorptionschromatographie durchgeführt wird.

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß ein weiterer Reinigungsschritt vorgesehen ist, der keine Adsorp-

- 21 -

tionschromatographie beinhaltet.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß ein Protein ausgewählt aus der Gruppe Transferrin, Albumin, Orosomucoid und Apolipoprotein in einer weiteren Fraktion gewonnen wird.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß ein Schritt zur Inaktivierung von gegebenenfalls vorhandenen Pathogenen durchgeführt wird.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß als Inaktivierung eine Behandlung mit Detergens, Lösungsmittel und/oder Hitze durchgeführt wird.

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß das Eluieren derart vorgenommen wird, daß die  $\alpha_1$ -AT-enthaltende Fraktion auch das Isomer mit einem pI-Wert zwischen 4,3 und 4,4 enthält.

31. Verwendung eines Trägermaterials zur Trennung von aktivem  $\alpha_1$ -AT von inaktiven  $\alpha_1$ -AT.

32. Verwendung nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß das Trägermaterial ein anorganisches Trägermaterial ist, vorzugsweise Hydroxylapatit, am meisten bevorzugt keramisches Hydroxylapatit.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No  
PCT/AT 98/00130

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 6 C07K14/81 A61K38/57 C07K1/16

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	S.K.CHAN ET AL.: "PURIFICATION AND CHEMICAL COMPOSITIONS OF HUMAN ALPHA 1-ANTITRYPSIN OF THE MM TYPE" FEBS LETTERS, vol. 35, no. 1, September 1973, pages 79-82, XP002075411 AMSTERDAM NL see the whole document ---	1-30
X	EP 0 698 615 A (BAYER CORPORATION) 28 February 1996 cited in the application see page 7; claim 10; example 1 ---	1-15, 17-23, 25-32 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

25 August 1998

04/09/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ryckebosch, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In national Application No

PCT/AT 98/00130

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	V.Y. BASIS ET AL.: "PURIFICATION OF HUMAN ALPHA-1-INHIBITOR OF PROTEASES AND PRODUCTION OF ANTISERUM FOR THE PROTEIN IMMUNOCHEMICAL ESTIMATION." VOPROSY MEDICINSKOJ CHIMII, vol. 33, no. 1, 1987, pages 54-59, XP002075412 MOSCOW, RU cited in the application see page 59 ---	1-6, 13-17, 23,24
X	C.B. GLASER ET AL.: "THE ISOLATION OF ALPHA-1-PROTEASE INHIBITOR BY A UNIQUE PROCEDURE DESIGNED FOR INDUSTRIAL APPLICATION." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY., vol. 124, 1982, pages 364-371, XP002075413 NEW YORK US see the whole document ---	1-15,17, 19-23, 25-29
X	WO 95 35306 A (ALPHA THERAPEUTIC CORPORATION) 28 December 1995 see examples 1,2 ---	1-15,17, 19-23, 25-29
X	EP 0 221 426 A (MILES LABORATORIES, INC.) 13 May 1987 see claims; examples ---	1-15, 17-23, 25-30
X	EP 0 097 274 A (MILES LABORATORIES, INC.) 4 January 1984 see page 10, line 25 - page 13, line 19; example 4 -----	1-15, 17-23, 25-30

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/AT 98/00130

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
EP 698615	A 28-02-1996	US	5610285 A		11-03-1997
		AU	3011195 A		07-03-1996
		CA	2156007 A		25-02-1996
		CN	1125231 A		26-06-1996
		JP	8176198 A		09-07-1996
WO 9535306	A 28-12-1995	NONE			
EP 221426	A 13-05-1987	US	4697003 A		29-09-1987
		AU	591397 B		30-11-1989
		AU	6462486 A		07-05-1987
		CA	1286848 A		23-07-1991
		DE	3686470 A		24-09-1992
		ES	2051684 T		01-07-1994
		JP	2030719 C		19-03-1996
		JP	7064750 B		12-07-1995
		JP	62108821 A		20-05-1987
EP 97274	A 04-01-1984	US	4379087 A		05-04-1983
		US	4439358 A		27-03-1984
		JP	2050389 C		10-05-1996
		JP	58225023 A		27-12-1983

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

I nationales Aktenzeichen  
PCT/AT 98/00130

**A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 6 C07K14/81 A61K38/57 C07K1/16

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	S.K.CHAN ET AL.: "PURIFICATION AND CHEMICAL COMPOSITIONS OF HUMAN ALPHA 1-ANTITRYPSIN OF THE MM TYPE" FEBS LETTERS, Bd. 35, Nr. 1, September 1973, Seiten 79-82, XP002075411 AMSTERDAM NL siehe das ganze Dokument ----	1-30
X	EP 0 698 615 A (BAYER CORPORATION) 28. Februar 1996 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 7; Anspruch 10; Beispiel 1 ---- -/-	1-15, 17-23, 25-32

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :  
 "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist  
 "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist  
 "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)  
 "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht  
 "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist  
 "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden  
 "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist  
 "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Rechercheberichts

25. August 1998

04/09/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ryckebosch, A

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

In nationales Aktenzeichen

PCT/AT 98/00130

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie <sup>3</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	V.Y. BASIS ET AL.: "PURIFICATION OF HUMAN ALPHA-1-INHIBITOR OF PROTEASES AND PRODUCTION OF ANTISERUM FOR THE PROTEIN IMMUNOCHEMICAL ESTIMATION." VOPROSY MEDICINSKOJ CHIMII, Bd. 33, Nr. 1, 1987, Seiten 54-59, XP002075412 MOSCOW, RU in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 59 ---	1-6, 13-17, 23,24
X	C.B. GLASER ET AL.: "THE ISOLATION OF ALPHA-1-PROTEASE INHIBITOR BY A UNIQUE PROCEDURE DESIGNED FOR INDUSTRIAL APPLICATION." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY., Bd. 124, 1982, Seiten 364-371, XP002075413 NEW YORK US siehe das ganze Dokument ---	1-15,17, 19-23, 25-29
X	WO 95 35306 A (ALPHA THERAPEUTIC CORPORATION) 28. Dezember 1995  siehe Beispiele 1,2 ---	1-15,17, 19-23, 25-29
X	EP 0 221 426 A (MILES LABORATORIES, INC.) 13. Mai 1987  siehe Ansprüche; Beispiele ---	1-15, 17-23, 25-30
X	EP 0 097 274 A (MILES LABORATORIES, INC.) 4. Januar 1984  siehe Seite 10, Zeile 25 - Seite 13, Zeile 19; Beispiel 4 -----	1-15, 17-23, 25-30

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 98/00130

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie			Datum der Veröffentlichung
EP 698615	A 28-02-1996	US	5610285	A	11-03-1997
		AU	3011195	A	07-03-1996
		CA	2156007	A	25-02-1996
		CN	1125231	A	26-06-1996
		JP	8176198	A	09-07-1996
WO 9535306	A 28-12-1995	KEINE			
EP 221426	A 13-05-1987	US	4697003	A	29-09-1987
		AU	591397	B	30-11-1989
		AU	6462486	A	07-05-1987
		CA	1286848	A	23-07-1991
		DE	3686470	A	24-09-1992
		ES	2051684	T	01-07-1994
		JP	2030719	C	19-03-1996
		JP	7064750	B	12-07-1995
		JP	62108821	A	20-05-1987
EP 97274	A 04-01-1984	US	4379087	A	05-04-1983
		US	4439358	A	27-03-1984
		JP	2050389	C	10-05-1996
		JP	58225023	A	27-12-1983